

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/082343 A1

(51) 国際特許分類: A61K 48/00, 45/00,  
9/51, 9/08, 38/45, A61P 1/16, 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02600

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 5 日 (05.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-97457 2002 年 3 月 29 日 (29.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術  
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY  
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市  
本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 黒田 俊一  
(KURODA, Shunichi) [JP/JP]; 〒565-0872 大阪府 吹  
田市 上山田 7 番 C-104 号 Osaka (JP). 谷澤 克  
行 (TANIZAWA, Katsuyuki) [JP/JP]; 〒563-0214 大阪  
府 豊能郡 豊能町 希望ヶ丘 2-30-2 Osaka (JP).

近藤 昭彦 (KONDO, Akihiko) [JP/JP]; 〒657-0015 兵  
庫県 神戸市 灘区 篠原 伯母野山町 1-2-806  
Hyogo (JP). 上田 政和 (UEDA, Masakazu) [JP/JP]; 〒  
162-0837 東京都 新宿区 納戸町 6 Tokyo (JP). 妹尾 昌  
治 (SENO, Masaharu) [JP/JP]; 〒703-8273 岡山県 岡山  
市 門田文化町 2-10-13 Okayama (JP). 岩路 秀彦  
(IWABUKI, Hidehiko) [JP/JP]; 〒791-0303 愛媛県 温泉  
郡 川内町 北方 3 1 1 4-405 Ehime (JP).

(74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo); 〒530-0041 大阪府 大  
阪市 北区 天神橋 2 丁目 2 番 6 号 大和南森町ビル  
原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUGS FOR TREATING LIVER DISEASES WITH THE USE OF HOLLOW PROTEIN NANOPARTICLES

(54) 発明の名称: タンパク質中空ナノ粒子を用いる肝臓疾患治療用薬剤

(57) Abstract: It is intended to provide drugs for treating liver diseases with the use of hollow protein nanoparticles, the therapeutic effects of which have been confirmed by animal experiments, and a treatment method with the use of these drugs. These drugs contain hollow protein nanoparticles made of a protein capable of forming particles (for example, hepatitis B virus surface antigen protein) in which a substance to be transferred into cells (for example, a herpes simplex virus-origin thymidine kinase gene for treating cancer) is encapsulated.

(57) 要約: タンパク質中空ナノ粒子を用いる肝臓疾患治療用薬剤であって、動物実験により実際に治療効果が認められた薬剤、およびこの薬剤を用いる治療方法を提供する。肝細胞認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質 (たとえば、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質) からなる中空ナノ粒子に、肝臓疾患治療用の細胞導入物質 (たとえば、癌治療用遺伝子である単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ遺伝子) が包含されてなる薬剤である。



WO 03/082343 A1

## 明 細 書

## タンパク質中空ナノ粒子を用いる肝臓疾患治療用薬剤

## 技術分野

5 本発明は、タンパク質中空ナノ粒子を用いる肝臓疾患治療用薬剤に関し、より詳細には、粒子内部に肝臓疾患治療用の細胞導入物質を包含し、この細胞導入物質を肝細胞内に特異的に導入可能な薬剤に関するものである。

## 背景技術

10 薬学分野において、患部に直接作用し、高い効果を示す副作用の少ない薬品の開発が盛んに行われている。特に、ドラッグデリバリーシステム（DDS）と呼ばれる方法は、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤等の有効成分を運搬し、目的箇所では有効成分を作用させることのできる方法として注目されている。

15 また、最近の分子細胞生物学の分野においても特定細胞への遺伝子導入は必要不可欠な技術として盛んに研究されている。さらに、ヒトゲノム計画の進展により各種疾患の遺伝的な背景が明らかになりつつある現在、このような細胞および組織に対する特異性の高い遺伝子導入法が確立されれば遺伝子治療の分野での応用も可能となる。

20 細胞に遺伝子を導入する方法としては、これまでに、遺伝子を巨大分子化してエンドサイトーシスによって遺伝子を取込ませる方法（リン酸カルシウム法、リポフェクタミン法）や、電気パルス刺激により細胞膜

に穿孔を開け、遺伝子を流入させる方法（エレクトロポレーション法、遺伝子銃法）が知られており、いずれも今日では分子生物学的実験において、一般的に実施されている手法である。

5 これらの方法は簡便であるが、細胞を直接、物理的に傷つけ、遺伝子導入部位を外科的に露出させる必要があるため、生体内部の細胞や組織には容易に適用できない。また、100%近い導入率を得ることは難しい。

10 一方、安全性の高い物質導入方法としてはリポソーム法が知られている。この方法は、細胞を傷つけることがないため、生体内部の細胞や組織にも適用することが可能である。しかし、単純な脂質であるリポソームに高度な細胞および組織特異性を付与することは困難であり、さら  
in vivo での遺伝子導入率は、要求される値に比べてはるかに低い  
う問題がある。

15 最近になって、ウィルスDNAに目的の遺伝子を組み込み、感染性ウィルスを生成して遺伝子導入を行う技術が開発された。この方法は導入部位を露出する必要がなく、個体にも応用でき、導入効率も100%近い画期的な方法として注目されるが、ウィルスが広範囲の細胞に非特異的に感染するため目的の細胞以外にも遺伝子が導入されてしまうという  
20 重大な問題がある。また、ウィルスゲノム本体が染色体に組み込まれ、将来予期できぬ副作用を引き起こす可能性があるため、実際には疾病の初期治療等には用いられず、末期の患者に適用されるに留まっているのが現状である。

以上のような状況に鑑み、本発明者らは、国際公開番号WO 01 / 64930（公開日：2001年9月7日）の国際出願（以下、「国際出

願W O O 1 / 6 4 9 3 0」 という) において、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入された中空ナノ粒子を用いて、目的とする細胞や組織に、物質（遺伝子、タンパク質、化合物等）を特異的かつ安全に運搬、導入するための方法を提案しているが、この方法を用いる特定臓器の疾患に対する治療薬の開発等がさらなる課題となっていた。

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、タンパク質中空ナノ粒子を用いる肝臓疾患治療用薬剤であって、動物実験により実際に治療効果が認められた薬剤、およびこの薬剤を用いる治療方法を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、ヒト肝臓由来組織部分に特異的に遺伝子が導入され、移植癌を治療する効果があることを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明に係る薬剤は、肝細胞認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子に、肝臓疾患治療用の細胞導入物質が包含されてなる薬剤である。

上記「粒子形成能を有するタンパク質」としては、たとえばB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を挙げることができる。このタンパク質は、真核細胞で発現させると、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出される。こうして得られた中空ナノ粒子は、肝細胞を認識し、肝細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することがで

きるので、肝臓疾患治療用の物質（薬剤）を包含させることにより、肝細胞に対して特異的かつ効果的に作用する有効な治療薬となる。

上記中空ナノ粒子内に包含させる細胞導入物質としては、たとえば癌治療用の遺伝子を挙げることができる。癌治療用遺伝子として、単純ヘルペスウィルス由来チミジンキナーゼ（HSV 1 tk）遺伝子を包含した薬剤を用いる場合は、後述の実施例に示すとおり、別途ガンシクロビルを投与する。

本発明の薬剤は、静脈注射という簡便な方法で肝臓疾患を効果的に治療することができ、従来の肝臓疾患の治療方法と大きく異なり、多量の薬剤の投与あるいは遺伝子治療等における外科手術を必要とせず、副作用の心配も極めて低く、その臨床応用可能なものである。

本発明の治療方法は、上記薬剤を投与することによる肝臓疾患の治療方法である。

本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の実施例における HBsAg 遺伝子の各タンパク質領域を表す概略模式図である。1～8 は、表面抗原における各部位の働きを示している。なお、図 1 中の符号 1 は、粒子形成抑制部位を示す。符号 2 は、直接的なヒト肝細胞特異的レセプターを示す。符号 3 は、糖鎖 1 を示す。符号 4 は、間接的なヒト肝細胞特異的レセプター（重合ヒト血清アルブミンレセプター）を示す。符号 5 は、膜貫通領域 1 を示す。

符号 6 は、膜貫通領域 2 を示す。符号 7 は、糖鎖 2 を示す。符号 8 は、膜貫通領域 3 を示す。

図 2 は、本発明の実施例における遺伝子組換え酵母を用いた H B s A g 粒子の発現および精製操作を例示した概略説明図であり、（a）は遺  
5 伝子組換え酵母の作製、（b）は H i g h - P i 培地における培養、（c）は 8 S 5 N - P 4 0 0 培地における培養、（d）は破碎、（e）は密度勾配遠心分離、（f）は H B s A g 粒子を示す図である。

図 3 は、本発明に係る薬剤について、実験動物で行った治療効果を示すグラフである。

10 図 4 は、細胞導入物質として利用可能なタンパク質を示す表である。

図 5 は、その他の細胞導入物質として利用可能なタンパク質を示す表である。

図 6 は、その他の細胞導入物質として利用可能なタンパク質を示す表である。

15 図 7 は、その他の細胞導入物質として利用可能なタンパク質を示す表である。

図 8 は、本発明に係る薬剤について、実験動物で行った治療効果を示す表である。

20 発明を実施するための最良の形態

本発明の薬剤を構成する中空ナノ粒子は、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子を導入することによって、肝細胞あるいは肝組織に特異的に物質を運搬することを可能とするものである。このような粒子形成能を有するタンパク質としては、種々のウィルスから得られるサブ

ウィルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウィルス（Hepatitis B Virus:HBV）表面抗原タンパク質等が例示される。

また、このような粒子形成能を有するタンパク質からなるタンパク質粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。つまり、真核細胞で粒子形成能を有するタンパク質を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出されるのである。このとき、真核細胞としては、酵母、昆虫細胞、哺乳細胞等の動物細胞などが適用できる。

本発明者らは、後述の実施例に示すとおり、遺伝子組換え酵母で上記HBV表面抗原Lタンパク質を発現させることにより、発現されたHBV表面抗原Lタンパク質から酵母由来の脂質二重膜に多数の同タンパク質が埋め込まれた短径約20nm、長径約150nmの楕円状中空粒子が形成されることを見出し、報告している（J. Biol. Chem., Vol.267, No.3, 1953-1961, 1992）。このような粒子は、HBVゲノムを全く含まないので、ウィルスとしては機能せず、人体への安全性が極めて高い。また、HBVの肝細胞への極めて高い感染力を担う肝細胞特異的レセプターを粒子表面に提示しているため、肝細胞に対して特異的に物質を運搬する運搬体としての効果も高いのである。

このように遺伝子組換え酵母を用いてタンパク質粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される点で好適である。

一方、昆虫細胞は、酵母よりも高等動物に近い真核細胞であるといえ、酵母では再現しきれない糖鎖等の高次構造をも再現できる点で異種タンパク質の大量生産において好ましい方法といえる。従来の昆虫細胞の系

はバキュロウイルスを用いた系で、ウイルス発現を伴うものであったために、タンパク質発現に際して細胞が死滅したり溶解したりした。その結果、タンパク質発現を連続的行ったり、死滅細胞から遊離したプロテアーゼによりタンパク質が分解したりするという問題があった。また、  
5 タンパク質を分泌発現させる場合には、培地中に含まれる大量の牛胎仔血清が混入することで、折角培地中に分泌されても精製が困難であった。しかし、最近になって、バキュロウイルスを介さない昆虫細胞系で、無血清培養可能なものが Invitrogen 社により開発され、市販されている。従って、このような昆虫細胞を用いれば、精製が容易で高次構造をも再  
10 現されたタンパク質粒子が得られる。

本発明のタンパク質中空ナノ粒子では、以上のような方法によって得られた粒子表面のレセプターを任意の生体認識分子としたり、  
種々の物質（DNA、RNA、タンパク質、ペプチド、および薬剤等）  
を粒子内に導入したりすることにより、肝細胞及び肝組織に極めて高い  
15 特異性で物質を運搬、導入することが可能となる。

もちろん、粒子形成能を有するタンパク質は、上記のB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質に限られるものではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよく、動物細胞、植物細胞、ウイルス、菌類等に由来する天然タンパク質や、種々の合成タン  
20 パク質等が考慮される。また、例えばウイルス由来の抗原タンパク質等が生体内において抗体を惹起する可能性がある場合などは、改変して抗原性を減少させたものを生体認識分子として用いてもよい。例えば、粒子形成能を有するタンパク質としては、国際出願WO 01/64930  
に開示される抗原性を減少させたB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質



であってもよいし、同国際出願に開示されるその他の改変型タンパク質（B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を、遺伝子操作技術を用いて改変したタンパク質）であってもよい。また、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質や同タンパク質を改変した改変型タンパク質に、さらに増殖因子や抗体などの他のタンパク質を付加したものを、粒子形成能を有するタンパク質として用いてもよい。

粒子形成能を有するタンパク質に導入される生体認識分子（換言すれば、肝細胞あるいは肝組織を認識する分子）としては、たとえば成長因子、サイトカイン等の細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞および組織を識別するための分子、ウィルスおよび微生物に由来する分子、糖質、脂質などが好ましく用いられる。

本発明では、以上のとおりのタンパク質中空ナノ粒子に、肝細胞または肝組織に導入したい物質（細胞導入物質）を内包させることによって、肝細胞特異性を有する物質運搬体が得られる。この物質運搬体に内包される細胞導入物質とは、例えばDNA、RNAなどの遺伝子、天然あるいは合成タンパク質、オリゴヌクレオチド、ペプチド、薬剤、天然あるいは合成化合物など、どのようなものであってもよい。

具体的には、既に発明者らにより報告されたヒトRNase 1（Jinno H, Ueda M, Ozawa S, Ikeda T, Enomoto K, Psarras K, Kitajima M, Yamada H, Seno M Life Sci. 1996;58(21):1901-8）またはRNase 3（別名ECP: eosinophil cationic protein; Mallorqui-Fernandez G, Pous J, Peracaula R, Aymami J, Maeda T, Tada H, Yamada H, Seno M, de Llorens R, Gomis-Ruth FX, Coll M; J

Mol Biol. 2000 Jul 28;300(5):1297-307.) 等が適用される。

これらのタンパク質は、細胞内外で作用し細胞傷害活性を有するものであるが、これらの R N a s e を本発明の物質運搬体（薬剤）に内包させて運搬することにより、細胞外では無毒化する一方、細胞内だけで作用させることができるので、より副作用の少ない新しい癌治療方法として期待される。

なお、上記細胞導入物質として、ほかに図 4 ～ 図 7 に示すタンパク質あるいは当該タンパク質をコードする遺伝子が挙げられ、さらに、肝臓疾患に有効なサイトカイン各種（インターフェロン各種、インターロイキン各種など）、癌抑制遺伝子（p 5 3 等）等の治療遺伝子も挙げることができる。

また、上記細胞導入物質を上記の中空ナノ粒子に導入する方法としては、通常の化学的、分子生物学的実験手法で用いられる様々な方法が適用される。たとえば、エレクトロポレーション法、超音波法、単純拡散法、あるいは電荷を有する脂質を用いる方法等が好ましく例示される。

そして、これらのタンパク質中空ナノ粒子、あるいは物質運搬体を用いて、in vivo あるいは in vitro で細胞、または組織に特異的に物質を導入することが可能となる。さらには、上記の R N a s e を用いた例のように、以上のとおりのタンパク質中空ナノ粒子からなる薬剤を用いて、特定細胞または組織に物質を導入することを各種疾患の治療法あるいは治療法の 1 ステップとして行うことも可能になるのである。

本発明の薬剤による治療効果については、後述の実施例に示すとおり、動物実験により実際に確認された。この実施例では、ヒト肝臓癌由来の

細胞を移植したヌードラットに、単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ（HSV1 tk）遺伝子を包含した本発明の薬剤を投与後、さらにガンシクロビル（ganciclovir:GCV）を投与した後、移植した癌組織の大きさを観察することにより治療効果を確認した。薬剤の投与は静脈内投与により行ったが、投与方法としては、このほかに、経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与等が挙げられる。

以下、実施例および比較例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

以下の実施例において、HBsAgとは、B型肝炎ウイルス表面抗原（Hepatitis B virus surface Antigen）を示す。HBsAgは、HBVの外被タンパク質であり、図1の模式図に示すように、HBsAgには、Sタンパク質、Mタンパク質、Lタンパク質の3種類がある。このうち、Sタンパク質は、3種のタンパク質に共通した、重要な外被タンパク質であり、Mタンパク質は、Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸（pre-S2 peptide）が付加したものである。また、Lタンパク質は、Mタンパク質のN末端側に、108もしくは119アミノ酸（pre-S1 peptide）が付加したものである。

HBsAg Lタンパク質のPre-S領域（pre-S1, pre-S2）は、HBVが肝細胞に結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている。Pre-S1は、肝細胞に直接結合する部位を持ち、pre-S2は、血中の重合アルブミンを介して肝細胞に結合する重合アルブミンレセプターを有するのである。

真核細胞でHBsAgを発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積される。HBsAgのLタンパク質は、

分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。

以下の実施例では、HBsAgのLタンパク質を用いた。また、図2に以下の実施例に記載されるHBsAg粒子の発現および精製操作の概略説明図を示した。

〔実施例A〕 遺伝子組換え酵母によるHBsAg粒子の発現

本発明者らによって報告された J. Biol. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992 記載の方法に基づいて、pGLDLIIP39-RcTを保持した遺伝子組換え酵母 (Saccharomyces Cerevisiae AH22R-株) を、合成培地 High-Pi および 8S5N-P400 中で培養し、HBsAg Lタンパク質粒子を発現させた。(図2a~c)

定常成長期(約72時間後)にある遺伝子組換え酵母を、Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co. 製) を用いて、whole cell extract を準備し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて分離して、銀染色によって試料中のHBsAgの同定を行った。

これより、HBsAgは分子量約52kDaのタンパク質であることが明らかとなった。

〔実施例B〕 HBsAg粒子の遺伝子組換え酵母からの精製

(1) 合成培地 8S5N-P400 で培養された遺伝子組換え酵母(湿重量26g)を buffer A 溶液(7.5M 尿素、0.1M リン酸ナトリウム、pH 7.2、1.5mM EDTA、2mM PMSF、0.1% Tween 80) 100ml に懸濁し、ガラスビーズを用いてビードビーター(BEAD-BEATER)にて酵母を破碎した。破碎後、上清を遠

心分離により回収した。(図2d)

(2) 次に、上清を0.75倍容の33% (w/w) PEG6000と混合し、30分間氷冷した。その後、遠心分離(7000rpm、30分間)を行い、ペレットを回収した。同ペレットは、Tween80

5 を含まないbuffer A溶液中で再懸濁した。

(3) 再懸濁した液を、10~40%の勾配をかけたCsClに重層し、28000rpm、16時間の超遠心分離を行った。遠心分離後の試料を12画分に分け、ウェスタンブロット法(Western Blotting)

(1次抗体は、anti-HBsAgモノクローナル抗体)によりHBsAg

10 sAgを含む画分を同定した。さらに、HBsAgを含む画分を、Tween80を含まないbuffer A溶液中で再懸濁した。

(4) (3) で得られた透析液を5~50%の勾配をかけたショ糖に重層し、28000rpm、16時間の超遠心分離を行った。遠心分離後、(3)と同様に、HBsAgを含む画分を同定し、HBsAg

15 sAgを含む画分を尿素とTween80は含まず、代わりに0.85%のNaClを含むbuffer A溶液で透析した。((2)~(4): 図2e)

(5) (4)と同様の操作を繰り返し、透析後の試料をウルトラフィルター(Ultra Filter) Q2000(アドバンテック社製)を用いて濃縮し、使用する時まで4℃にて冷蔵保存した。(図2f)

20

CsCl平衡遠心分離後のウェスタンブロット(3)の結果から、HBsAgは、分子量52kDaでS抗原性を有するタンパク質であることが分かった。最終的に、培地2.5L由来、湿重量26gの菌体から、約24mgの精製HBsAg粒子を得た。

一連の精製過程における画分を銀染色 SDS-PAGE で解析した。  
また、精製により酵母由来のプロテアーゼが除去されていることを確認  
するために、(5) で得られた HBsAg 粒子を 37℃ で 12 時間イン  
キュベートした後、SDS-PAGE を行い、銀染色により同定を行っ  
た。

その結果、酵母由来のプロテアーゼは、一連の精製過程において完全  
に除去されていることが確認された。

〔実施例 C〕 HBsAg 粒子への HSV1 tk 遺伝子の封入 (HS  
V1 tk 遺伝子を包含した HBsAg 粒子の製造)

次に、上記方法により作製した HBsAg 粒子内へ、癌治療用遺伝子  
として単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ (HSV1 tk) 遺  
伝子を封入し、溶媒として HSV1 tk 遺伝子を包含した H  
BsAg 粒子を製造した。

上記 HSV1 tk 遺伝子が導入された癌細胞では、この HSV1 tk  
遺伝子が発現することによりガンシクロビル (ganciclovir: GCV) に対し  
て感受性になり、ガンシクロビルが投与されると、強力な巻き添え効果  
を惹起しつつ、癌細胞は死滅する。このように、HSV1 tk 遺伝子は、  
癌遺伝子治療に広く使用される遺伝子の 1 つである。

本実施例では、HBsAg 粒子内へ HSV1 tk 遺伝子を封入するた  
め、HSV1 tk 遺伝子を発現する Invivogen 社製のベクター pGT65  
-hIFN- $\alpha$  を使用し、この発現ベクターをエレクトロポレーション  
法により HBsAg 粒子内に導入することによって、HSV1 tk 遺伝  
子が包含された HBsAg 粒子を作製した。具体的には、HBsAg 粒  
子中の Lタンパク質粒子 50  $\mu$ g に対し、上記発現ベクター 10  $\mu$ g 導

入した。またこのとき、PBSバッファーを使用し、エレクトロポレーションの条件は、220V、950 $\mu$ Fで4mmのキューベットを使用して行った。

〔実施例D〕 ヒト肝臓癌を移植したヌードラットに対するHSV1 tk 遺伝子包含HBsAg粒子による癌治療効果

次に、上記方法により作製したHSV1 tk 遺伝子を包含するHBsAg粒子の肝臓癌に対する治療効果を実験動物により確認した。

本実施例では、実験動物として日本クレアから購入したヌードラット（系統：F344/NJcl-rnu/rnu、性別：メス）の両側背部皮下に、ヒト肝臓癌由来細胞HuH-7（JCRB0403）、および陰性対照としてヒト大腸癌由来細胞WiDr（ATCC CCL-218）を有するそれぞれの担癌ラットに治療効果を確認した。上記担癌ラットは、それぞれの腫瘍細胞をMatrigel（ベクトン&ディッキンソン社製）と混合して、使用説明書どおりに使用して、上記ヌードラットに腫瘍生着させ、生着させた腫瘍が直径2～3cm程度の固形癌になるまで約3週間生育させることにより得た。

その後、上記担癌ラットに、約10 $\mu$ gのHSV1 tk 遺伝子を包含するHBsAg粒子を尾静脈より投与した（静脈注射した）。そして、静脈注射の5日後から、上記担癌ラットに対し、浸透圧ポンプ（alzet osmotic pump; Cat 番号 2ML2）を用いてガンシクロビル（GCV）を50mg/kg/dayの割合で投与した。上記浸透圧ポンプは、GCVを含む薬液とともに上記担癌ラットの背中皮下に移植した。このガンシクロビルの投与は、最大14日間行った。ガンシクロビル投与後、上記担癌ラットの腫瘍組織の状態（大きさ）を経時的に観察した。具体的に

は、ノギスで腫瘍部分の短径と長径とを測定し、腫瘍容積近似式（長径×短径×短径／2）を計算して行った。測定は、ネズミ3連で行った。その結果を下記の図3および図8に示す。

図3および図8に示すように、ヒト大腸癌由来の腫瘍組織（W i D  
5 r）では経時的な退縮は観察されず、治療効果は認められなかったのに対して、ヒト肝臓癌由来の腫瘍細胞（N U E）では経時的な退縮が観察され、H B s A g - H S V 1 t k 粒子による肝臓癌特異的な治療効果が認められた。

このように、本発明に係る薬剤としての上記H B s A g - H S V 1  
10 t k 粒子は、ヒト肝細胞に対して極めて高い特異性と効率で遺伝子導入が可能であり、肝臓癌に対して実際に治療効果があることが認められた。また、本実験により、上記H B s A g - H S V 1 t k 粒子に  
治療のためのプロトコールを実験動物で確立することができた。

尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実  
15 施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

## 20 産業上の利用の可能性

以上のように、本発明に係る薬剤は、静脈注射という簡便な方法で、肝臓癌などに代表される肝臓疾患を特異的かつ効果的に治療することができ、従来の遺伝子治療と大きく異なり、大手術を必要とせず、副作用の心配もきわめて低く、そのまま臨床応用可能なものである。



## 請 求 の 範 囲

1. 肝細胞認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子に、肝臓疾患治療用の細胞導入物質が包含されてなる薬剤。

5 2. 請求の範囲1に記載の上記タンパク質は、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質であることを特徴とする薬剤。

3. 請求の範囲1または2に記載の上記細胞導入物質は、遺伝子であることを特徴とする薬剤。

10 4. 請求の範囲3に記載の上記遺伝子は、癌治療用の遺伝子であることを特徴とする薬剤。

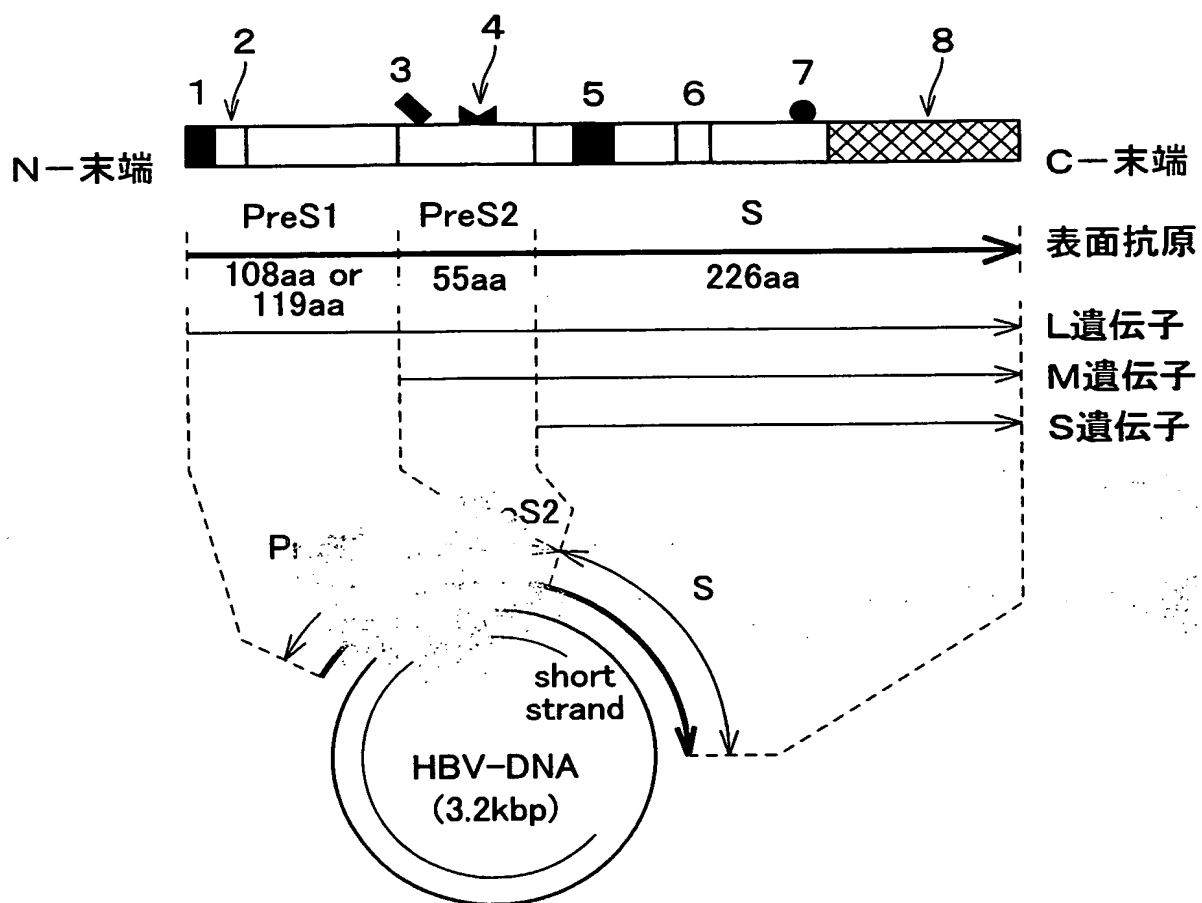
5. 請求の範囲4に記載の上記遺伝子は、ヘルペスウィルス由来チミジンキナーゼ（HSV1 tk）遺伝子であることを特徴とする薬剤。

6. 請求の範囲1～5のいずれか1項に記載の薬剤は、静脈注射により人体に投与されることを特徴とする薬剤。

15 7. 請求の範囲1～6のいずれか1項に記載の薬剤を投与することによる肝臓疾患の治療方法。

1/8

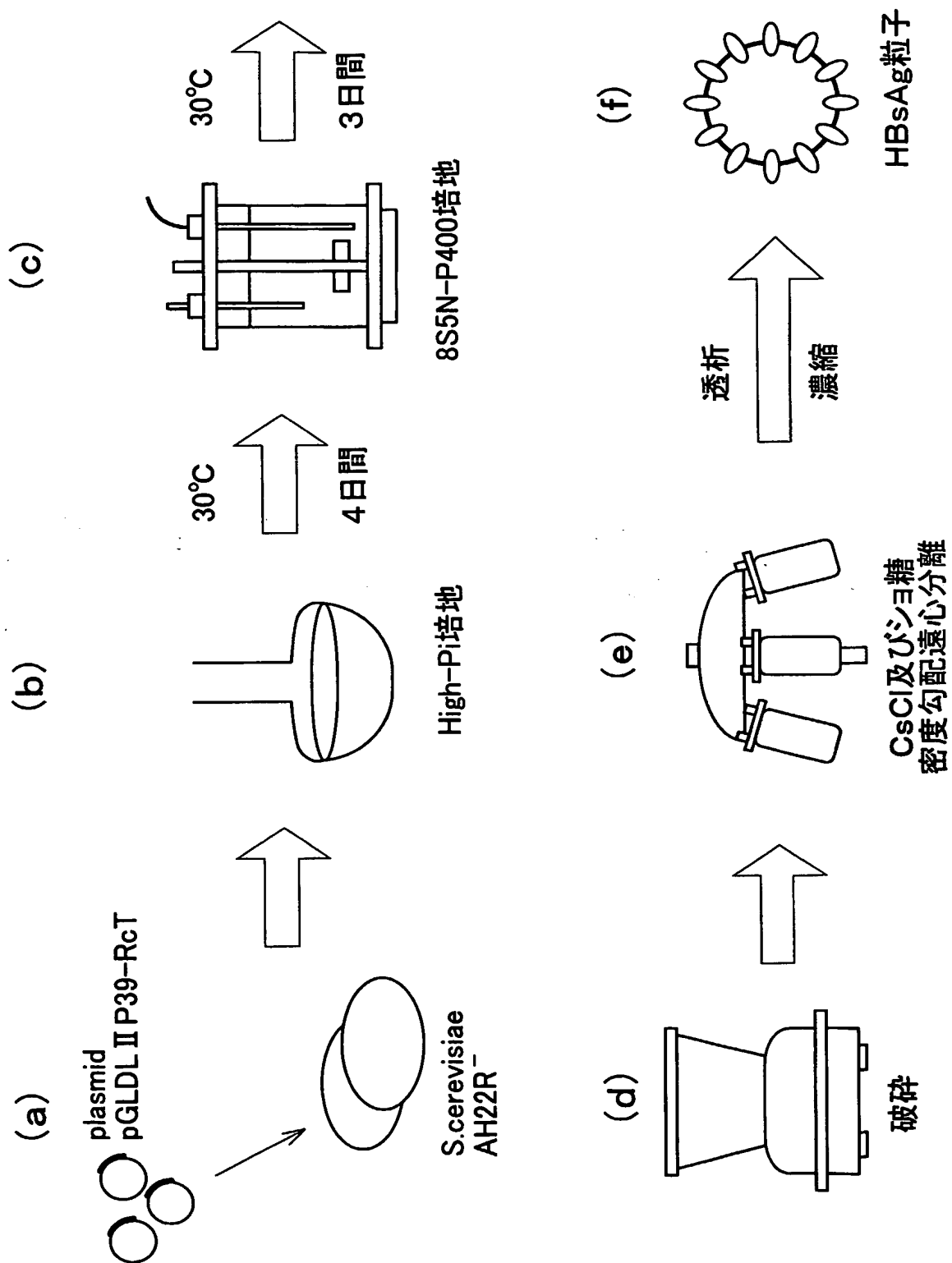
図 1



- 1 粒子形成抑制部位
- 2 直接的なヒト肝細胞特異的レセプター
- 3 糖鎖1
- 4 間接的なヒト肝細胞特異的レセプター  
(重合ヒト血清アルブミンレセプター)
- 5 膜貫通領域1
- 6 膜貫通領域2
- 7 糖鎖2
- 8 膜貫通領域3

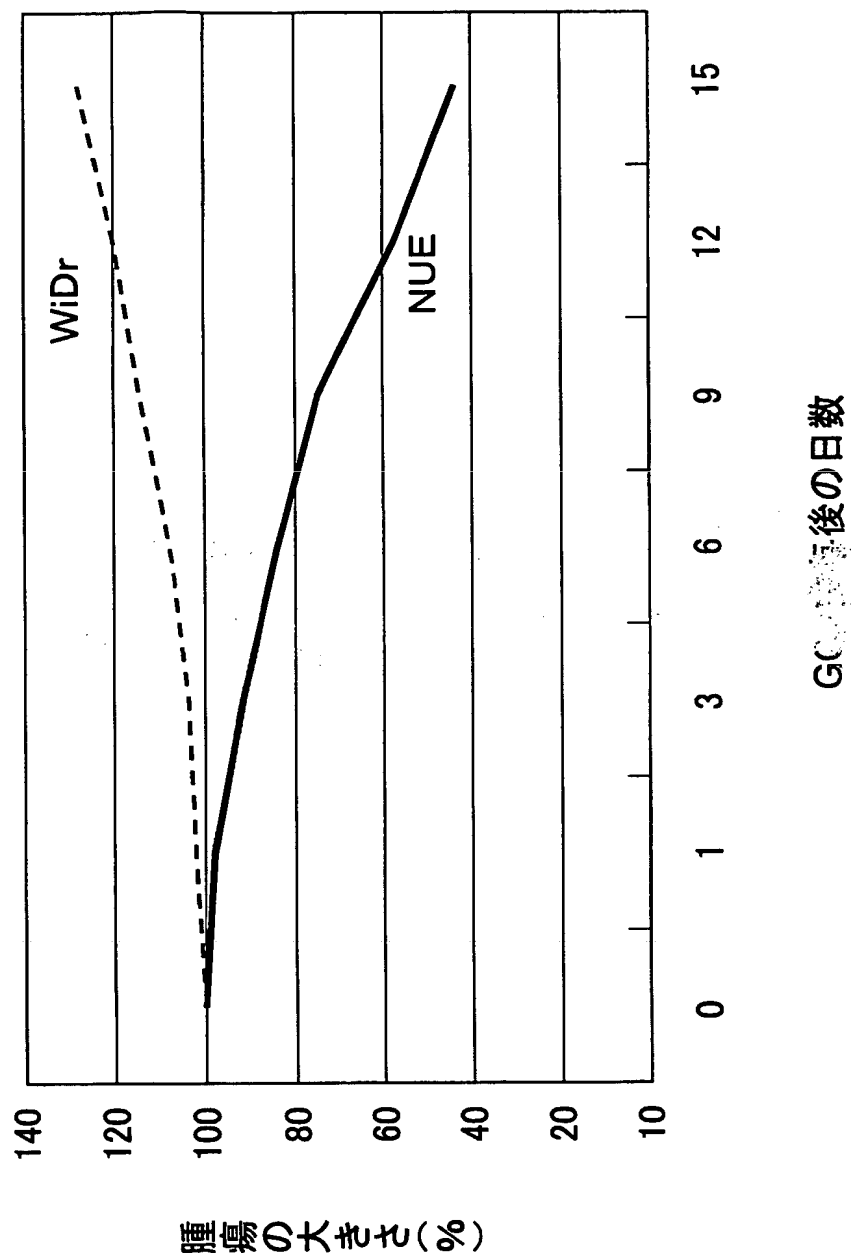
2 / 8

図 2



3/8

図 3



## 図 4

RNase等の細胞質RNA を攻撃するタンパク質	Pancreatic type Rnases from vertebrates
	RNase 1 or Bovine RNase A
	Eosinophil derived neurotoxin
	Eosinophil cationic protein
	Liver RNase (RNase 4)
	Angiogenin
	Bovine seminal RNase
	Frog Rnases (Onconase etc.)
膜透過を妨げる タンパク質	Streptolysin(Streptococcus pyogenes)
	Cholesterol binding toxins (Streptococcus. Bacillus. Clostridium. Listeria)
	alpha-Toxin (Staphylococcus aureus)
	Delta-Toxin (Staphylococcus aureus) and melittin (Apis mellifera)
	Aerolysin (Aeromonas hydrophila)
	Escherichia coli hemolysin
シグナル伝達を妨げる タンパク質	Cholera toxin (Vibrio cholerae)
	Heat-labile enterotoxin (E. coli)
	Pertussis toxin (Bordetella pertussis)
	Exoenzyme C3 (Clostridium botulinum)
	Adenylate cyclase toxin (Bordetella sp.)
	Anthrax edema factor (Bacillus anthracis)
タンパク質合成を妨げる タンパク質	Diphtheria toxin (Corynebacterium diphtheriae)
	Pseudomonas aeruginosa exotoxin A
	Shiga toxins (Shigella dysenteriae serotype I, Escherichia Coli)
	Ricin (Ricinus communis)
	Ribosome-inactivating proteins
	alpha-Sarcin and related toxins (Aspergillus)
細胞骨格を攪乱する タンパク質	C2 toxin (Clostridium botulinum type C and D)
	Cytotoxic necrotizing factors (Escherichia coli)
	Enterotoxin A and cytotoxin B (Clostridium difficile)
	ActA (Listeria monocytogenes)
	IcsA (Shigella flexneri)
	Zonula occludens toxin (Vibrio cholerae)

5/8

図 5

免疫または炎症反応を抑えるタンパク質	Pyrogenic exotoxins (superantigens) (Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes)
	Anthrax lethal toxin (Bacillus anthracis)
	Leukocidins and gamma lysins (Staphylococcus sp.)
膜輸送を攪乱するタンパク質	Tetanus neurotoxin (Clostridium tetani)
	VAMP-specific botulinum neurotoxins
	Botulinum neurotoxins type A and E (Clostridium botulinum)
	Botulinum neurotoxin type C (Clostridium botulinum)
	Vacuolating cytotoxin (Helicobacter pylori)
ナトリウムチャネル攪乱タンパク質	alpha-Scorpion toxins
	beta-Scorpion toxins
	Excitatory insect selective neurotoxins from scorpion
	Depressant insect selective neurotoxins from scorpion
	mu-Conotoxins (Conus geographus)
	mu-Agatoxins (Agelenopsis aperta)
	Anthopleurin-A, -B, and -C (anemone toxin)
	Anemone toxins (type II)
	Calitoxins
カリウムチャネル攪乱タンパク質	Kaliotoxin
	Scyllatoxin (Leiurus quinquestriatus hebraeus)
	Apamin (honey bee Apis mellifera)
	MCD peptide (honey bee Apis mellifera)
	Charybdotoxin and iberiotoxin (Leiurus quinquestriatus var. hebraeus and Buthus tamulus)
	Margatoxin, noxiustoxin, and kaliotoxin (Centruroides margaritatus, Centruroides noxius, Androctonus mauretanicus)
	Dendrotoxins (Dendroaspis species)
	Sea anemone potassium channel toxins

6/8

## 図 6

カルシウムチャネル攪乱 タンパク質	Omega-Conotoxins (Conus spp.)
	Omega-Agatoxins (Agelenopsis aperta)
	Omega-Grammotoxin SIA (Grammostola spatulata Chilean pink tarantula)
	Hololena toxin (Hololena curta)
	PLTXII (Plectreurys tristes)
	Calciseptine (Dendroaspis polylepis)
	Calcicludeine (Dendroaspis angusticeps)
	beta-Leptinotarsin-h
	Taicatoxin (Oxyuranus scutellatus scutellatus)
アセチルコリン受容体攪乱 タンパク質	alpha-Bungarotoxin (Bungarus multicinctus)
	alpha-Cobratoxin (Naja kaouthia)
	Erabutoxins (Laticauda semifasciata)
	Toxin alpha ('Naja nigricollis')
	kappa-Bungarotoxin (Bungarus multicinctus)
	alpha-Conotoxins (Conus spp.)
	Snake toxins against muscarinic acetylcholine receptors
	Muscarinic toxin-1~5, -7, m1-toxin from green mamba (Dendroaspis angusticeps)
リアノジン受容体カルシウムイオンチャネル攪乱 タンパク質	Muscarinic toxin-alpha, -beta from black mamba (Dendroaspis polylepis)
	Helothermine (Heloderma horridum horridum)

7/8

図 7

シナプス前攪乱タンパク質	beta-Bungarotoxin ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
	Rattlesnake venom neurotoxins: crotoxin-related proteins
	Ammodytotoxins ( <i>Vipera ammodytes ammodytes</i> )
	Notexins ( <i>Notechis scutatus scutatus</i> )
	Textilotoxin ( <i>Pseudonaja textilis textilis</i> )
	Tai poxin
	alpha-Latrotoxin (black widow spider)
	alpha-Latroinsectotoxin ( <i>Latrodectus mactans tred ecimguttatus</i> )
	Pardaxin ( <i>Pardachirus marmoratus</i> )
	Palytoxin (Corals of the spp. <i>Palythoa</i> )
	Equinatoxins ( <i>Actinia equina</i> L., sea anemone)
グルタミン酸受容体攪乱タンパク質	Conantokins ( <i>Conus</i> spp.)



8/8

図 8

		G C V 投与後の日数						
		0	1	3	6	9	1 2	1 5
腫瘍の大きさ (%)	N U E	100	99	93	85	74	58	43
	W i D r	100	102	105	109	114	120	128

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02600

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, A61K45/00, A61K9/51, A61K9/08, A61K38/45,  
A61P1/16, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, A61K45/00, A61K9/51, A61K9/08, A61K38/45,  
A61P1/16, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLus (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Shunichi KURODA et al., "Bionano Ryushi o Mochiiru Atarashii Idenshi Donyu-ho no Kaihatsu to Sentan Iryo eno Oyo", Materials Integration, July, 2002, Vol.15, No.7, pages 12 to Y	1-6
P, X	Masaru MURAOKA et al., "Tokui-sei Kaihen-gata Chuku nano Ryushi no Kaikaku" Hyomen Kogen Nenkai Kenkyu Happyo Koen-shu, 23 February, 2003 (23.02.03), 68th, page 443, L304	1-6
Y	WO 01/64930 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORP.), 07 September, 2001 (07.09.01), & EP 1262555 A1 & JP 2001-316298 A	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
06 June, 2003 (06.06.03)

Date of mailing of the international search report  
24 June, 2003 (24.06.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02600

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Tadanori YAMADA et al., "B-gata Haien Virus Hyomen Kogen Nano Ryushi o Mochiita Atarashii Idenshi Donyu-ho no Kaihatsu", Kagaku Kogakkai Nenka Kenkyu Happyo Koen Yoshishu, 02 March, 2001 (02.03.01), 66th, page 271, F307	1-6
A	EP 201416 A1 (INST PASTEUR), 12 November, 1986 (12.11.86), & FR 2581394 A1 & JP 61-258000 A & DE 3679609 A1 & JP 8-198897 A	1-6
A	DELPEYROUX, F. et al., "Insertions in the hepatitis B surface antigen. Effect on assembly and secretion of 22-nm particles from mammalian cells", J.Mol. Biol., 1987, Vol.195, No.2, pages 343 to 350	1-6
Y	OKADA, H. et al., "Effective cytokine gene therapy against an intracranial glioma using a retrovirally transduces IL-4 plus HSVtk tumor vaccine", Gene Therapy, 1999, Vol.6, No.2, pages 219 to 226	1-6
Y	WO 01/93836 A1 (BOULIKAS T), 13 December, 2001 (13.12.01) Full text, claim 9 & EP 1292284 A2 & JP 10-511951 A	1-6
Y	QIAN, et al., "Induction of sensitivity to ganciclovir in human hepatocellular carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase.", Hepatology, 1995, Vol.22, pages 118 to 123	1-6
A	WO 96/21014 A2 (CHIRON VIAGENE INC), 11 July, 1996 (11.07.96), & AU 9646080 B & EP 796331 A1 & JP 10-511951 A	1-6
A	WO 96/9074 A1 (GEN HOSPITAL CORP.), 28 March, 1996 (28.03.96), & AU 9536750 B & EP 785803 A1 & US 5731182 A & JP 10-506530 A & US 5871986 A & US 6238914 A	1-6
A	WO 01/60415 A1 (IMMUNE RESPONSE CORP.), 23 August, 2001 (23.08.01), & AU 2001/38485 B	1-6
A	KURODA, S. et al., "Hepatitis B virus envelope L protein particles", J.Biol.Chem., 1992, Vol.267, No.3, pages 1953 to 1961	1-6
A	CA 2131415 A1 (GERMANY), 05 September, 1995 (05.09.95), (Family: none)	1-6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02600

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 7 involves method for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K48/00, A61K45/00, A61K9/51, A61K9/08, A61K38/45, A61P1/16, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K48/00, A61K45/00, A61K9/51, A61K9/08, A61K38/45, A61P1/16, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPlus (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	黒田俊一他, 'バイオナノ粒子を用いる新しい遺伝子導入法のと先端医療への応用' Materials Integration, Jul. 2005, no. 7, p. 12-17	1-6
P, A	村岡優他, 'ドラッグデリバリーを目指した特異性改変型B型肝炎表面抗原中空ナノ粒子の開発' 化学工学会年会研究発表講演要旨集, 2003. 02. 23, 68th, p. 443 L304	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 06. 03

国際調査報告の発送日

24.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

印

4C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 01/64930 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORP) 2001.09.07 & EP 1262555 A1 & JP 2001-316298 A	1-6
Y	山田忠範他, 'B型肝炎ウイルス表面抗原ナノ粒子を用いた新しい 遺伝子導入法の開発' 化学工学会年会研究発表講演要旨集, 200 1.03.02, 66th, p.271 F307	1-6
A	EP 201416 A1 (INST PASTEUR) 1986.11.12 & FR 2581394 A1 & JP 61-258000 A & DE 3678609 A1 & JP 8-198897 A	1-6
A	DELPEYROUX, F. et al. 'Insertions in the hepatitis B surface antigen. Effect on assembly and secretion of 22-nm particle s from mammalian cells.' J. Mol. Biol., 1987, vol.195, no.2, p.343-350	1-6
Y	OKADA, H. et al. 'Effective cytokine gene therapy against an intracranial glioma using a retrovirally transduced IL-4 pl us HSVtk tumor vaccine.' Gene Therapy, 1999, vol.6, no.2, p.219-226	1-6
Y	WO 01/93836 A1 (BOULIKAS T) 2001.12.13 文献全体、例えばcl aim9 & AU 2001/75423 B & EP 1292284 A2 & US 2003/72794 A	1-6
Y	QIAN, C. et al. 'Induction of sensitivity to ganciclovir in human hepatocellular carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase.' He patology, 1995, vol.22, p.118-123	1-6

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 96/21014 A2 (CHIRON VIAGENE INC) 1996.07.11 & AU 9646080 B & EP 796331 A1 & JP 10-511951 A	1-6
A	WO 96/9074 A1 (GEN HOSPITAL CORP) 1996.03.28 & AU 9536750 B & EP 785803 A1 & US 5731182 A & JP 1 0-506530 A & US 5871986 A & US 6238914 A	1-6
A	WO 01/60415 A1 (IMMUNE RESPONSE CORP) 2001.08.23 & AU 2001/38485 B	1-6
A	KURODA, S. et al. 'Hepatitis B virus envelope L protein part icles.' J. Biol. Chem., 1992, vol. 267, no. 3, p. 1953-1961	1-6
A	CA 2131415 A1 (GERMANY) 1995.09.05 (family: none)	1-6

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲7は、治療による人体の処置方法に関する態様を含むものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。